

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Oligonucléotides monocaténares, sondes, amorces et procédé de
détection des spirochètes

La présente invention concerne le domaine des techniques de détection et/ou d'amplification et de séquençage, à l'aide de sondes ou d'amorces
5 oligonucléotidiques, et l'application de ces sondes ou amorces pour détecter la présence ou identifier les bactéries de l'ordre des *Spirochaetales* (spirochètes).

Dans le cadre de certains tests de diagnostic, notamment lors d'une recherche d'infection humaine ou animale dans le système nerveux ou d'une recherche après piqûre d'arthropode par exemple, il est souvent nécessaire d'obtenir une réponse
10 rapide concernant la présence de bactéries, et plus précisément de spirochètes, dans un échantillon. Toutefois, les techniques couramment développées, telles qu'un examen direct après coloration de Gram ou une mise en culture, sont souvent mises en échec par l'absence de prise de colorant de Gram et l'absence de croissance dans les milieux de culture.

Dans le cas des spirochètes, qui constituent une famille de bactéries regroupant les espèces *Leptospira*, *Borrelia*, *Treponema* et *Serpulina* et étant responsables de maladies infectieuses, telles que la méningoencéphalite, la mise en culture n'est pas possible. L'identification des spirochètes n'a donc pas encore été résolue.
15

Etant donné l'accroissement de ces maladies infectieuses ces vingt dernières années et les conséquences dramatiques de ces états pathologiques infectieux, il est
20 nécessaire de mettre au point une méthode rapide et spécifique de détection des pathogènes infectieux que sont les spirochètes.

Une solution possible, permettant de palier à l'impossibilité d'une mise en culture des bactéries, réside dans l'utilisation des technologies relatives aux acides
25 nucléiques et au matériel génétique, notamment des méthodologies PCR (Polymerase Chain Reaction), afin de déterminer si un gène, une partie de gène ou une séquence nucléotidique est présent chez un organisme vivant, un extrait cellulaire de cet organisme ou un échantillon. Etant donné que tout gène ou partie de gène est caractérisé par une séquence spécifique de bases nucléotidiques, il est par conséquent
30 possible de rechercher directement la présence de tout ou partie de ladite séquence spécifique au sein d'un échantillon contenant un mélange de polynucléotides.

Différents types de méthodes de détection des acides nucléiques sont décrits dans la littérature. Ces méthodes reposent sur les propriétés d'appariement purine-

pyrimidine des brins complémentaires d'acides nucléiques dans les duplex ADN-ADN et ARN-ARN. Ce processus d'appariement s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogène entre les bases adénine-thymine (A-T) et guanine-cytosine (G-C) de l'ADN double brin. Des paires de bases adénine-uracile (A-U) peuvent également se former par liaison hydrogène dans les duplex ADN-ARN ou ARN-ARN. L'appariement de brins d'acide nucléique pour la détermination de la présence ou de l'absence d'une molécule d'acide nucléique donnée est communément appelé "hybridation d'acides nucléiques" ou simplement "hybridation".

10 Un exemple de méthodologie PCR comprend la détermination d'une séquence sur la base de l'ARNr 16S. Toutefois, cette méthode présente des limites liées aux problèmes potentiels de contaminations qui gênent le diagnostic.

Pour pallier à cet inconvénient, de nouveaux marqueurs génétiques permettant la détection spécifique de bactéries appartenant à l'ordre des spirochètes dans tout échantillon, sans étape préalable de culture bactérienne, ont été trouvés. Ces nouveaux marqueurs, qui sont des oligonucléotides, constituent un objet de l'invention.

La détermination de ces nouveaux marqueurs repose sur l'utilisation de séquences spécifiquement définies dans le gène *rpoB* des spirochètes codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. En effet, on a trouvé sur l'ADN codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne, des zones qui sont variables selon les familles bactériennes, mais qui apparaissent conservées parmi l'ordre des spirochètes, ce qui permet de discriminer cette famille bactérienne parmi d'autres familles bactériennes. L'observation selon laquelle il existe dans lesdites zones conservées des variations mineures de séquences entre certaines espèces de spirochètes a permis de mettre au point ces marqueurs spécifiques de l'ordre des spirochètes.

Selon Lazcano et al. [J. Mol. Evol. (1988) 27:365-376], les ARN polymérases sont divisées en deux groupes selon leur origine, l'un constitué par les ARN polymérases virales ARN- ou ADN-dépendantes, et l'autre constitué par les ARN polymérases ADN-dépendantes d'origine eucaryote ou procaryote (archaeobactéries et

eubactéries). Les ARN polymérases ADN-dépendantes eubactériennes sont caractérisées par une constitution multimérique simple et conservée notée “ core enzyme ”, représentée par $\alpha\beta\beta'$, ou “ holoenzyme ” représentée par $\alpha\beta\beta'\sigma$ [Yura and Ishihama, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 : 59-97].

5 De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle fonctionnel, au sein du complexe enzymatique multimérique, de la sous-unité β de l'ARN polymérase eubactérienne. Les ARN polymérases archaebactérienne et eucaryote présentent, pour leur part, une structure plus complexe pouvant atteindre une dizaine, voire une trentaine de sous-unités [Pühler et al . Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86 :4569-
10 4573].

Les gènes qui codent pour les différentes sous-unités $\alpha\beta\beta'\sigma$ de l'ARN polymérase ADN-dépendante chez les eubactéries, respectivement les gènes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoD*, sont classés en différents groupes comprenant des gènes codant pour des protéines constitutives des sous-unités ribosomiques ou pour des enzymes
15 impliquées dans la réplication et la réparation du génome [Yura and Yshihma, Ann. Rev. Genet. (1979) 13 :59-97]. Certains auteurs ont montré que les séquences nucléiques des gènes *rpoB* et *rpoC* pouvaient être utilisées afin de construire des arbres phylogénétiques [Rowland et al., Biochem. Soc. Trans. (1992) 21:40s] permettant de séparer les différents embranchements et sous-embranchements parmi
20 les règnes du vivant.

Avant d'exposer plus en détail l'invention, différents termes, utilisés dans la description et les revendications, sont définis ci-après :

- par “ acide nucléique extrait de bactéries ” on entend soit l'acide nucléique total, soit l'ADN génomique, soit les ARN messagers, soit encore l'ADN obtenu à
25 partir de la transcription inverse des ARN messagers ;

- un “ fragment nucléotidique ” ou un “ oligonucléotide ” sont deux termes synonymes désignant un enchaînement de motifs nucléotidiques de type ADN ou ARN caractérisé par une séquence informationnelle des acides nucléiques naturels (ou éventuellement modifiés) et susceptibles de s'hybrider, comme les acides
30 nucléiques naturels, avec un fragment nucléotidique complémentaire ou sensiblement complémentaire, dans des conditions prédéterminées de stringence stricte.

L'enchaînement peut contenir des motifs nucléotidiques de structure différente de celle des acides nucléiques naturels. Un fragment nucléotidique (ou oligonucléotide) peut contenir par exemple jusqu'à 100 motifs nucléotidiques. Il contient généralement au moins 10, et en particulier au moins 12 motifs nucléotidiques et peut
5 être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- «un motif nucléotidique» est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée choisie parmi l'adénine, la guanine,
10 l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs précédents ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine qui peut s'hybrider avec toute base A, T, U, C ou G, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine ou toute autre
15 base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide [PE Nielsen et al., Science, (1991) 254:1497-1500], soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple par remplacement par des esters choisis notamment parmi les diphosphates, les alkyl- et arylphosphonates et les phosphorothioates,

20 - par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information analogue à celle donnée par la séquence des acides nucléiques naturels,

- par "hybridation", on entend le processus au cours duquel, dans des
25 conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de s'associer par des liaisons hydrogène stables et spécifiques, pour former un double brin. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la "stringence", c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est
30 effectuée à plus forte stringence. La stringence est fonction notamment de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de

mésappariement entre deux acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction d'hybridation, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépend notamment des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent éventuellement être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine. En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65 °C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1M,

- une " sonde " est un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 12 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un acide nucléique ayant, dans le cas présent, une séquence nucléotidique comprise soit dans un ARN messager, soit dans un ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN messager, produit de transcription; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection) ou à des fins de thérapie,

- une " sonde de capture " est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption, ou par synthèse directe sur un solide. Des exemples de supports comprennent les plaques de microtitration et les puces à ADN,

- une " sonde de détection " peut être marquée au moyen d'un agent marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, les enzymes, en particulier les enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline), les composés chimiques chromophores, les composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, les analogues de bases nucléotidiques et les ligands tels que la biotine,

- une " sonde d'espèce " est une sonde permettant l'identification de l'espèce d'une bactérie,

- une " sonde de genre " est une sonde permettant l'identification du genre d'une bactérie,

- une " amorce " est une sonde comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans
5 une technique d'amplification telle que la PCR, dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription, etc.

Un premier objet de la présente invention est un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs
10 nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4 décrites dans le listage de séquences en fin de description et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.

Dans chacune des séquences SEQ ID n° 1 à 4, le nucléotide « N » mentionné dans le listage de séquences en fin de description représente un nucléotide identique
15 ou différent à chacune des 3 positions où il apparaît et peut représenter l'inosine ou un mélange équimolaire de 4 nucléotides différents choisis parmi A, T, C et G ou le cas échéant A, U, C et G.

Lorsque « N » représente undit mélange équimolaire de nucléotides à une position donnée, cela signifie que le nucléotide à ladite position donnée représente
20 indifféremment A, T, C ou G (ou respectivement le cas échéant A, U, C ou G) et que l'oligonucléotide selon l'invention est constitué plus exactement d'un mélange équimolaire de 4 groupes d'oligonucléotides dans chacun desquels groupes « N » a une signification différente à ladite position donnée et représente respectivement dans chacun des 4 groupes A, T, C et G.

25 Dans chacune des séquences SED ID n° 1 à 4, lorsque dans les 3 positions où un nucléotide « N » apparaît, N représente undit mélange équimolaire des 4 nucléotides A, T, C et G (ou N le cas échéant A, U, C et G), l'oligonucléotide comprenant ladite séquence représente donc un mélange de 4^3 (64) oligonucléotides.

Comme mentionné dans les définitions, l'oligonucléotide selon l'invention
30 peut être sous forme d'un oligodésoxyribonucléotide (ADN) ou d'un oligoribonucléotide (ARN) pour lesquels dans ce cas « T » est remplacé par « U ».

En particulier, un oligonucléotide selon la présente invention possède au moins 12 motifs tels que décrits ci-dessus et au plus 50 motifs. Plus particulièrement, un oligonucléotide selon la présente invention possède de 12 à 35 motifs.

Un oligonucléotide préféré a une séquence choisie parmi les séquences
5 SEQ ID N°1 à 4, ou les séquences complémentaires.

La séquence SEQ ID N°1, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n°1, possède 20 acides nucléiques. La séquence SEQ ID N°2, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n° 2, possède 21 acides nucléiques. La séquence SEQ ID N°3, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n° 3, possède 20 acides
10 nucléiques. Enfin, la séquence SEQ ID N°4, qui est la séquence de l'amorce appelée amorce n°4, possède 17 acides nucléiques.

Dans la nomenclature faisant référence au gène *rpoB* chez E.COLI, les premiers nucléotides des séquences SEQ ID n° 1 à 4 correspondent aux positions suivantes :

- 15 - SEQ ID n° 1 : 1 730,
 - SEQ ID n° 2 : 2 900,
 - SEQ ID n° 3 : 3 700,
 - SEQ ID n° 4 : 3 850.

Les inventeurs ont découvert et mis en évidence que lesdites séquences SEQ ID
20 n° 1 à 4, telles que définies ci-dessus, sont non seulement consensuelles entre les spirochètes, mais qu'elles sont en outre spécifiques de la famille des spirochètes et encadrent un fragment du gène *rpoB* comprenant une zone très variable dont la séquence est spécifique de l'espèce et du genre serovar dans une espèce de *spirochète*.

25 En effet, aux positions correspondant à celles des nucléotides « N » dans les séquences SEQ ID n° 1 à 4, on trouve des nucléotides variables dans les séquences cible complémentaires en fonction de l'espèce de la bactérie considérée, mais les autres nucléotides sont conservées dans toutes les espèces de bactéries de la famille des spirochètes. Et, du fait que « N » représente l'inosine qui peut s'hybrider avec
30 toute base, ou un mélange équimolaire des 4 bases A, T, C et G, un oligonucléotide ou un mélange d'oligonucléotides selon l'invention comprend toujours un

oligonucléotide pouvant s'hybrider avec une séquence cible complémentaire d'une bactérie spirochète.

En outre, comme les séquences SEQ ID n° 1 à 4 encadrent des zones variables dont les séquences sont spécifiques pour chaque espèce de bactérie de la famille des spirochètes, les séquences SEQ ID n° 1 à 4 permettent non seulement de préparer les sondes spécifiques de la famille des spirochètes, mais aussi de détecter et identifier l'espèce de ladite bactérie par amplification PCR en utilisant lesdites séquences comme amorces.

Dans un mode de réalisation des oligonucléotides selon l'invention, « N » représente dans toutes les positions une inosine.

Dans un autre mode de réalisation, l'oligonucléotide selon l'invention représente un mélange d'oligonucléotides (notamment 4^P oligonucléotides) comprenant des séquences incluses dans l'une des séquences SEQ ID n° 1 à 4, dans lesquelles tous les nucléotides A, T, C et G sont représentés à chacune desdites positions où « N » apparaît (notamment p positions, p représentant un nombre entier).

Les séquences SEQ ID N°1 à 4 peuvent être préparées par synthèse chimique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans l'article de Itakura K. et al. [(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323].

Une première application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries appartenant à l'ordre des spirochètes qui comprend une séquence nucléotidique d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4, et leurs séquences complémentaires. Dans la suite de la description, une telle sonde de l'invention sera appelée « sonde de genre ».

Les sondes selon l'invention peuvent être utilisées, à des fins de diagnostic, dans la recherche de la présence ou de l'absence d'un acide nucléique cible dans un échantillon, selon toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques de dépôt ponctuel sur filtre, dites " DOT-BLOT " [Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor], les techniques de transfert d'ADN dites " SOUTHERN BLOT " [Southern. E.M., J. Mol. Biol. (1975) 98:503], les techniques de transfert d'ARN dites " NORTHERN BLOT ", ou les techniques dites

“ sandwich ” [Dunn A.R., Hassel J.A. (1977) Cell 12:23]. On utilise en particulier la technique “ sandwich ”, avec une sonde de capture et/ou une sonde de détection, lesdites sondes étant capables de s’hybrider avec deux régions différentes de l’acide nucléique cible, et l’une au moins desdites sondes (généralement la sonde de détection) étant capable de s’hybrider avec une région de la cible qui est spécifique de l’espèce ou du groupe d’espèces recherché, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent avoir des séquences nucléotidiques au moins partiellement différentes.

L’acide nucléique à détecter (cible) peut être de l’ADN ou de l’ARN (l’un ou l’autre éventuellement obtenu après amplification par PCR). Dans le cas de la détection d’une cible de type acide nucléique double brin, il convient de procéder à la dénaturation de ce dernier avant la mise en œuvre du procédé de détection. L’acide nucléique cible peut être obtenu par extraction selon les méthodes connues des acides nucléiques d’un échantillon à examiner. La dénaturation d’un acide nucléique double brin peut être effectuée par les méthodes connues de dénaturation chimique, physique ou enzymatique, et en particulier par chauffage à une température appropriée, supérieure à 80 °C.

Pour mettre en oeuvre les techniques d’hybridation précitées, et en particulier les techniques “ sandwich ”, une sonde de l’invention, appelée sonde de capture, est immobilisée sur un support solide, et une autre sonde de l’invention, appelée sonde de détection, est marquée avec un agent.

Les exemples de support et d’agent marqueur sont tels que définis précédemment.

Un autre objet de l’invention est un procédé de détermination de la présence ou de l’absence d’au moins un spirochète, dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d’au moins une telle bactérie, comprenant les étapes consistant à mettre en contact ledit échantillon avec au moins une sonde de genre de l’invention, puis à déterminer de façon connue en soi la formation ou l’absence de formation d’un complexe d’hybridation entre ladite sonde et l’acide nucléique de l’échantillon.

Des exemples de détection de la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique comprennent les techniques décrites ci-dessus, à savoir les techniques "DOT-BLOT", "SOUTHERN-BLOT" et "sandwich".

5 Selon une mise en oeuvre particulière de ce procédé pour la détermination de la présence ou l'absence d'une espèce ou d'un groupe d'espèces de spirochète, on utilise d'une part une sonde de genre de l'invention et d'autre part une sonde d'espèce de l'invention, étant entendu que lesdites sondes de genre et d'espèce sont capables de s'hybrider avec des régions non chevauchantes d'un acide nucléique
10 correspondant au gène *rpoB* des spirochètes.

De manière avantageuse, la sonde de genre est immobilisée sur un support solide, et la sonde d'espèce est marquée avec un agent marqueur.

La présente invention a aussi pour objet l'application du procédé de l'invention pour déterminer la présence d'une espèce de spirochète déterminée.

15 En effet, les résultats des recherches, mettant en évidence les alignements de séquences conservées chez les espèces de spirochètes, selon la méthode d'alignement CLUSTAL [Higgins D.G. & Sharp P.M. (1989) Gene 73:237-244], lesdites séquences ayant 1170 bases situées entre les positions 1730 et 2900 du gène *rpoB* en faisant référence à la numérotation du gène *rpoB* de *Escherichia coli* ATCC 25290,
20 permettent de détecter la présence ou l'absence d'au moins une bactérie quelconque de l'ordre des spirochètes. L'utilisation de sondes contenant des zones mutées pour une espèce particulière (par rapport à l'espèce de référence, ici *E. coli*), rend possible la détection directe d'une telle espèce. Dans les techniques d'hybridation sandwich, utilisant deux sondes en combinaison (sonde de capture et sonde de détection), on
25 utilisera par exemple en combinaison une sonde spécifique de la famille des spirochètes et une sonde spécifique de l'espèce considérée. On peut aussi utiliser en combinaison deux sondes spécifiques de ladite espèce, lorsqu'elles existent, ces deux sondes étant complémentaires de régions non chevauchantes du gène *rpoB*.

30 Une autre application d'un oligonucléotide de l'invention est son utilisation comme amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques

incluse dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à 4, qui est utilisable dans la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase par un procédé connu en soi, notamment dans des méthodes d'amplification utilisant une telle synthèse en présence d'une polymérase (PCR, RT-PCR, etc.). En particulier, une amorce de l'invention peut être utilisée pour la transcription inverse spécifique d'une séquence d'ARN messager d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces de spirochètes pour obtenir une séquence d'ADN complémentaire correspondante. Une telle transcription inverse peut constituer le premier stade de la technique RT-PCR, le stade suivant étant l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire obtenu. On peut également utiliser les amorces de l'invention pour l'amplification spécifique par réaction de polymérisation en chaîne de la séquence de l'ADN du gène *rpoB* d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces de spirochètes.

Selon un cas particulier, ladite amorce comprenant un oligonucléotide de l'invention comprend en outre la séquence sens ou anti-sens d'un promoteur reconnu par une ARN polymérase (promoteurs T7, T3, SP6 par exemple [Studier FW, BA Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189:113] : de telles amorces sont utilisables dans des procédés d'amplification d'acide nucléique faisant intervenir une étape de transcription, tels que, par exemple, les techniques NASBA ou 3SR [Van Gemen B. et al. Abstract MA 1091, 7th International Conference on AIDS (1991) Florence, Italy]

Un autre objet de l'invention est une amorce nucléotidique comprenant un oligonucléotide monocaténaire choisi parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans l'une des séquences SEQ ID n°1 à SEQ ID N°4 qui est utilisable pour le séquençage total ou partiel du gène *rpoB* chez une quelconque des espèces de spirochètes. En particulier, l'amorce nucléotidique est utilisable pour le séquençage d'un acide nucléique amplifié.

En effet, les amorces oligonucléotidiques objets de l'invention permettent l'amplification puis le séquençage du gène *rpoB* chez tout spirochète, et l'identification de tout spirochète par analyse bio-informatique de cette séquence et la reconnaissance de nouvelles espèces de spirochètes inconnues. Le séquençage est l'obtention de la séquence totale ou partielle du gène *ropB* par un procédé connu en

soi, polymérisation absortive utilisant des di-déoxynucléotides [Sanger F., Coulson A.R. (1975) J. Mol. Biol. 94:441] ou hybridations multiples utilisant les puces à ADN.

Les amorces n° 1 à n° 3 peuvent être utilisées comme amorces 5' et les
5 amorces n° 2 à n° 4 comme amorces 3' pour amplifier un fragment de gène *rpoB* encadré en 5' et 3' par lesdites amorces.

Dans un mode de réalisation, on utilise donc un jeu de deux amorces consistant dans deux oligonucléotides différents choisis parmi les oligonucléotides ayant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques incluses dans les séquences SEQ ID
10 N° 1 à 3 pour l'amorce 5' et respectivement SEQ ID N° 2 à 4 pour l'amorce 3'.

La présente invention a donc également pour objet un procédé, caractérisé en ce qu'on amplifie tout d'abord le fragment du gène *rpoB* de ladite bactérie avec des amorces selon l'invention, puis on met en contact ledit fragment avec une sonde de ladite bactérie selon l'invention, et on détermine la formation ou l'absence de
15 formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et ledit fragment.

La présente invention a également pour objet un procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie de l'ordre des *spirochaetales* dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec des
20 amorces selon l'invention, puis on réalise une amplification et on détermine l'apparition ou l'absence d'un produit d'amplification.

Dans un mode de réalisation, un procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie de l'ordre des *spirochaetales* dans un échantillon biologique contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques de ladite
25 bactérie, est caractérisé en ce qu'on amplifie et on réalise le séquençage d'un fragment du gène *rpoB* de ladite bactérie dans ledit échantillon à l'aide d'amorces selon l'invention et on compare la séquence du fragment du gène *rpoB* du gène obtenu avec la séquence connue du fragment du gène *rpoB* de ladite bactérie, et on détermine ainsi la présence de ladite bactérie dans l'échantillon si la séquence du
30 fragment obtenu est identique à la séquence connue du fragment du gène *rpoB* de ladite bactérie.

La présente invention a également pour objet une sonde de détection, dans un échantillon biologique, spécifique d'une espèce de bactérie appartenant à l'ordre des *spirochaetales*, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment du gène *ropB* pouvant être obtenu par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention, de
5 préférence avec l'une des séquences SEQ ID n° 1 à 3 comme amorce 5' et l'une des séquences SEQ ID n° 2 à 4 comme amorce 3'. Ledit fragment du gène *rpoB* encadré par les oligonucléotides selon l'invention correspond en effet à une zone très variable selon les espèces desdites bactéries appartenant à l'ordre des *spirochaetales* et spécifique pour chaque dite espèce.

10 Enfin, un dernier objet de l'invention est une sonde de thérapie génique pour traiter les infections provoquées par au moins une espèce ou un groupe d'espèces de spirochètes, ladite sonde comprenant un oligonucléotide tel que défini précédemment. Cette sonde de thérapie génique, capable de s'hybrider sur l'ARN messager et/ou sur l'ADN génomique desdites bactéries, peut bloquer les
15 phénomènes de traduction et/ou de transcription et/ou de réplication.

Le principe des méthodes de thérapie génique est connu et repose notamment sur l'utilisation d'une sonde correspondant à un brin anti-sens : la formation d'un hybride entre la sonde et le brin sens est capable de perturber au moins l'une des étapes du décryptage de l'information génétique. Les sondes de thérapie génique sont
20 donc utilisables comme médicaments antibactériens, permettant de lutter contre les infections causées par des spirochètes.

L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 et 2 sur
25 lesquelles :

- la figure 1 est une photographie d'un gel d'électrophorèse mettant en évidence la détection des spirochètes à partir d'une suspension mixte bactérienne en utilisant les sondes de l'invention ; et

- la figure 2 est une photographie d'un gel d'électrophorèse mettant en évidence
30 l'amplification spécifique par PCR de fragments du gène *rpoB* des spirochètes en utilisant les amorces de l'invention.

Les souches de spirochètes utilisées dans les exemples ci-après, à savoir *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa* serovar *patoc* (appelée ci-après *Leptospira biflexa*), *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (appelée ci-après *Leptospira icterohaemorrhagiae*) et
5 *Leptospira interrogans* serovar *australis* (appelée ci-après *Leptospira australis*), ont toutes été obtenues de la collection ATCC, à l'exception de *Borrelia recurrentis* qui est disponible auprès du Centre National de référence, Institut Pasteur Paris (France). Le numéro ATCC de *Borrelia burgdorferi* est 35210, celui de *Treponema Pallidum* 27087, celui de *Leptospira biflexa* 23582, celui de *Leptospira icterohaemorrhagiae*
10 43642 et celui de *Leptospira australis* 23605.

Les souches *Borrelia* et *Leptospira* ont été cultivées à 30°C sur les milieux BSKII et EMJH, respectivement [Barbour A.G. (1984) Yale J. Biol. Med. 57:521]. Comme *T. pallidum* ne peut pas être cultivée *in vitro*, cette bactérie pathogène a été propagée par injections dans les testicules d'un lapin.

15 Les autres souches de bactéries utilisées, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont été isolées cliniquement de patients hospitalisés à Marseille.

20 EXEMPLE 1 : Détection spécifique des spirochètes à l'aide des sondes de l'invention

Cette expérience a été réalisée avec les souches de spirochètes suivantes : *Borrelia burdorferi*, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira. Icterohaemorrhagiae*, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis*, ainsi qu'avec *Staphylococcus aureus*.

25 On a préparé une suspension bactérienne mixte en mélangeant un ADN de spirochète avec un extrait de *Staphylococcus aureus*.

On a réalisé une méthode PCR en utilisant la trousse QIAamp tissue kit (Qiagen) et la Taq Polymérase de Gibco (Gibco BRL, USA). Après une première étape de dénaturation (94°C pendant 2 min), on a répété 35 fois un cycle de 3 étapes
30 à 94°C pendant 30 s, 52°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On a terminé le

programme PCR, on a purifié et séquencé les amplicons résultants comme indiqué précédemment.

Les résultats sont indiqués sur la figure 1, sur laquelle
la bande 1 correspond aux marqueurs de masse moléculaire (Boehringer),
5 la bande 2 correspond à *S. aureus* seul,
la bande 3 correspond à *B. burgdorferi* + *S. aureus*,
la bande 4 correspond à *B. recurrentis* + *S. aureus*,
la bande 5 correspond à *T. pallidum* + *S. aureus*,
la bande 6 correspond à *L. biflexa* + *S. aureus*,
10 la bande 7 correspond à *L. australis* + *S. aureus*,
la bande 8 correspond à *L. icterohaemorrhagiae* + *S. aureus*.

Les amorces utilisées étaient :

panneau A : les amorces d'ARNr 16S FD1 et RD3 [Weisburg et al. J. Bacteriol. (1991) 173:697-703]

15 panneau B : les amorces 1730D et 2900R de l'invention.

L'amorce 1730D a la séquence SEQ ID N°1 (5'CTTGGNCCNGGNGGACTTTC3') dans laquelle "N" est l'inosine et l'amorce 2900R a la séquence SEQ ID N°2 (5'AGAAATNAANATNGCATCCTC3') dans laquelle "N" est l'inosine.

20 Les résultats montrent que les amorces de l'invention n'ont pas été capables d'amplifier l'ADN de *S. aureus* seul, et donc de détecter *S. aureus*, mais ont été capables d'amplifier celui des spirochètes, et donc de le détecter, même en présence de *S. aureus* (panneau B), contrairement aux amorces 16S qui ont été capables d'amplifier l'ADN de *S. aureus* seul (panneau A).

25

EXEMPLE 2 : Amplification spécifique de fragments de gène *rpoB* à l'aide des amorces de l'invention

Cette expérience a été réalisée avec les souches de spirochètes suivantes :
Borrelia burgdorferi, *Treponema pallidum*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira*
30 *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis*, ainsi qu'avec les

autres souches non spirochètes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La séquence du gène *rpoB* de *Treponema pallidum* utilisée est celle décrite par Weinstock et al. [(1998) The genome of *Treponema pallidum* : new light on the agent of syphilis. *FEM Microbiol. Rev.* 22:323-332].

La séquence du gène *rpoB* de *Borrelia burgdorferi* utilisée est celle décrite par Alekshun et al. [(1997) Molecular cloning and characterization of *Borrelia burgdorferi* *rpoB*. *Gene* 186:227-235].

Les séquences d'ADN du gène *rpoB* de *Leptospira biflexa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira australis* et *Borrelia recurrentis* ont été obtenues par PCR de la façon suivante :

L'ADN génomique de *Leptospira biflexa* a été extrait en suivant les procédures standards au phénol/chloroforme [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY]. Dans cette première étape d'expériences, on a réalisé les amplifications par PCR avec les amorces SEB1 (5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3') et SEB2 (5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3') (SEB pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Borrelia subtilis*) et la *Taq* ADN polymérase de Eurogentec (de la société Seraing, Belgique) en utilisant 5 µl d'ADN pour un volume final de 50 µl. Après une première étape de dénaturation (95°C pendant 1,5 min), on a répété 35 fois un cycle à 3 étapes de 95°C pendant 20 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On a terminé le programme PCR par une seule étape d'extension de 3 min à 72°C (modèle de cycle thermique Peltier PTC 200, MJ Research, Watertown, MA, USA).

On a ensuite séparé les amplicons obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et on les a visualisés par coloration avec du bromure d'éthidium.

On a réalisé le séquençage du gène par purification des échantillons avec le kit de purification PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Allemagne) et on les a mis à réagir avec le tampon de réaction dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction buffer (kit de séquençage d'ADN, Perkin-Elmer). Enfin, on a effectué une électrophorèse des produits réactionnels avec le séquenceur d'ADN automatique Applied Biosystems model ABI 310 (Perkin-Elmer).

La séquence de l'extrémité 5' du gène *rpoB* a été obtenue en utilisant la trousse Universal Genome Walker™ (Clontech, Palo Alto, CA, USA) de la façon suivante. Cinq regroupements de fragments d'ADN génomique appelés "banques" Genome Walker ont été construits en utilisant les enzymes de restriction *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI* et *StuI*. Ces banques ont été utilisées pour un séquençage en amont de l'ADN génomique en utilisant, d'une part, une amorce spécifique du gène dont la séquence correspond à la région aussi proche que possible de l'extrémité 5' connue du gène et, d'autre part, une amorce d'adaptation fournie dans la trousse.

On a purifié les fragments amplifiés et on a utilisé une source d'ADN pour une deuxième PCR emboîtée. On a ensuite traité les amplicons obtenus comme décrit précédemment pour le séquençage automatisé.

Le gène *rpoB* de *Leptospira biflexa* obtenu a la séquence SEQ ID N°5 et possède 3876 acides nucléiques. Le gène *rpoB* de *Leptospira icterohaemorrhagiae* obtenu a la séquence SEQ ID N°6 et possède 914 acides nucléiques. Le gène *rpoB* de *Leptospira australis* obtenu a la séquence SEQ ID N°7 et possède 949 acides nucléiques. Enfin, le gène *rpoB* de *Borrelia recurrentis* obtenu a la séquence SEQ ID N°8 et possède 800 acides nucléiques.

Les séquences d'ADN du gène *rpoB* de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* et *Pseudomonas aeruginosa* sont décrites dans la littérature (Gen Bank).

Les fragments du gène *rpoB* à amplifier étaient constitués de 949 pb.

Les amplifications par PCR des fragments du gène *rpoB* ont été réalisées comme dans l'exemple 3, à ceci près qu'on a utilisé chaque espèce séparément.

Les résultats sont indiqués sur la figure 2, sur laquelle :

- la bande 1 correspond aux marqueurs de masse moléculaire (Boehringer),
- la bande 2 correspond à *B. burgdorferi*,
- la bande 3 correspond à *B. recurrentis*,
- la bande 4 correspond à *T. pallidum*,
- la bande 5 correspond à *L. biflexa*,
- la bande 6 correspond à *L. australis*,
- la bande 7 correspond à *L. icterohaemorrhagiae*,

la bande 8 correspond à *E. coli*,
la bande 9 correspond à *S. aureus*,
la bande 10 correspond à *Str. salivarius*,
la bande 11 correspond à *Ps. aeruginosa*,
5 la bande 12 correspond à un témoin négatif sans ADN.

Les amorces utilisées étaient :

panneau A : l'amorce 1730D et l'amorce 2900R de l'invention,
panneau B : l'amorce 1730D et l'amorce 3800R de l'invention et
panneau C : les amorces d'ARNr 16S RD1 et FD3.

10 L'amorce 3800R a la séquence SEQ ID N°4 (5'GCTTCNAGNGCCCANAC3')
dans laquelle "N" est l'inosine.

Les résultats montrent que les amorces de l'invention ont permis uniquement
l'amplification des fragments de l'ADN des spirochètes (panneaux A et B), tandis que
les amorces 16S ont tout amplifié (panneau C).

15 L'amorce SEQ ID n° 3 (5'GGGTGNATTTTNTCATCNAC3') peut aussi être
utilisée comme amorce. Les amorces n° 1 et 3 selon l'invention ont permis par
amplification puis séquençage du produit amplifié la détection et l'identification de la
bactérie *Borrelia duttonii* dans une tique africaine collectée qui ZAÏRE de l'espèce
ornithodoros moubata et le sang total d'un patient zaïrois présentant une fièvre
20 récurrente.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotides monocaténares choisis parmi les oligonucléotides comprenant une séquence d'au moins 12 motifs nucléotidiques consécutifs incluse
5 dans l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°4 dans lesquelles « N » représente un nucléotide identique ou différent choisi parmi l'inosine ou un mélange équimolaire de 4 nucléotides différents choisis parmi A, T, C ou G, et parmi les oligonucléotides complémentaires de ces oligonucléotides.
2. Oligonucléotides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'il
10 comprennent de 12 à 35 motifs nucléotidiques.
3. Oligonucléotides selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils ont une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 1 à 4 et les séquences complémentaires.
4. Oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que
15 « N » représente l'inosine.
5. Oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'ils comprennent un mélange l'oligonucléotides comprenant des séquences incluses dans l'une des séquences SEQ ID n° 1 à 4 dans lesquelles tous les nucléotides A, T, C et G sont représentés à chacune des positions où « N » apparaît.
20
6. Sonde pour la détection, dans un échantillon biologique, de bactéries appartenant à l'ordre des *Spirochaetales* caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Sonde selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est immobilisée sur un support solide.
- 25 8. Sonde selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est marquée avec un agent traceur.
9. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie appartenant à l'ordre des *spirochaetales* dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie,
30 caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, puis on détermine la formation ou

l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon.

10. Amorce nucléotidique utilisable pour la synthèse en présence d'une polymérase, et le séquençage total ou partiel du gène *rpoB* chez l'une quelconque des
5 espèces de bactéries appartenant à l'ordre des *spirochaetales*, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5.

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on réalise une amplification d'un fragment du gène *rpoB* de ladite bactérie, avec au moins une
10 sonde de ladite bactérie selon l'une des revendications 6 à 8, et on détermine la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et ledit fragment.

12. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie appartenant à l'ordre des *spirochaetales* dans un échantillon contenant ou
15 susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, caractérisé en ce qu'on met en contact ledit échantillon avec des amorces selon l'une la revendication 10, puis on réalise une amplification et on détermine l'apparition ou l'absence d'un produit d'amplification.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on réalise le
20 séquençage du fragment du gène *rpoB* amplifié et on compare la séquence dudit fragment obtenu avec la séquence connue du gène *rpoB* de ladite bactérie, et on détermine ainsi la présence de l'espèce de ladite bactérie si le séquençage dudit fragment obtenu est identique à ladite séquence connue.

14. Sonde de détection dans un échantillon biologique, spécifique d'une espèce
25 de bactérie appartenant à l'ordre des *spirochaetales*, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment du gène *ropB* pouvant être obtenu par amplification à l'aide d'amorce selon la revendication 10.

15. Sonde de thérapie génique, caractérisée en ce qu'elle comprend un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5.

1 / 2

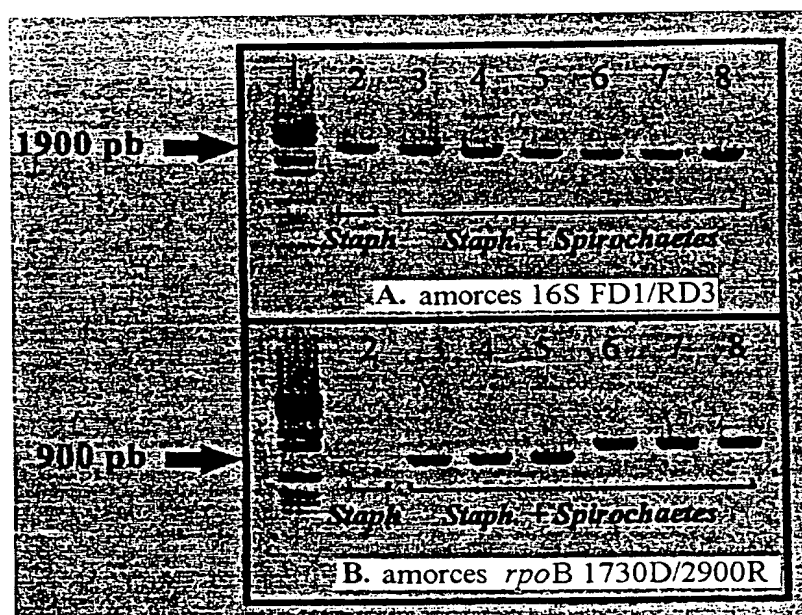


FIG.1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 2

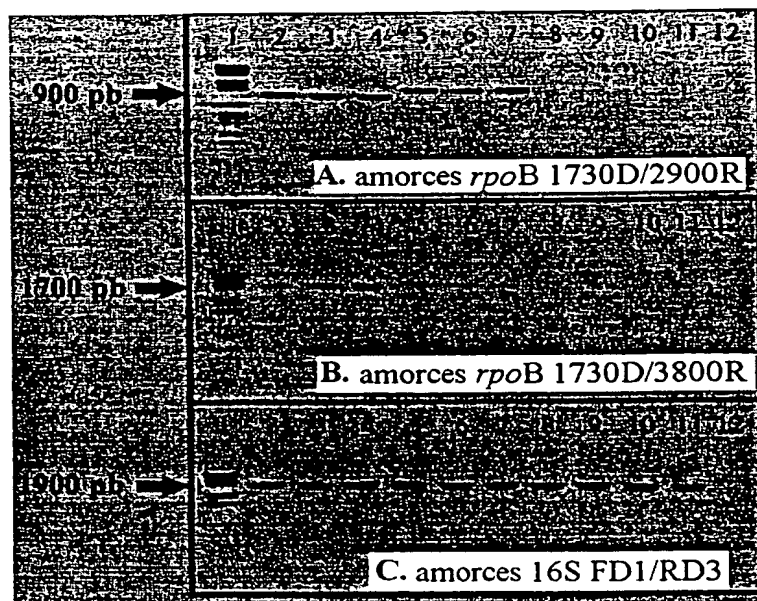


FIG.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)

<120> Oligonucléotides monocaténaïres, sondes, amorces
et procédé de détection des spirochètes

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°1

<400> 1

cttggncng gnggactttc

20

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°2

<400> 2

agaaatnaan atngcatcct c

21

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°3

<400> 3

gggtgnattt tntcatcnac

20

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle : amorce n°4

<400> 4

gcttcnagn cccanac

17

<210> 5

<211> 3876

<212> ADN

<213> Leptospira biflexa

<400> 5

gctgatatta agaaaaaact ncgaaggtn tgggnctcaa gtagaagttg ctggctgccc 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggttaatcgg ttgcccaatt tttaaaccba gtcttcaaaa acttagaggc agggaggccg
120
taggcgtccc cacctctatt ttttcgttta tcataccatc tattatitttg acgtctctag
180
ggagagtatt ccatgcatac ccgaatgcaa attagaaacc gggtaaattt cggtaaaatt
240
accgacctca atttacttcc taatcttata tacgtacaga aaaaatcctt tgattgggtc
300
ctccagtcgg aagtgaaga tccgacgaaa cgtttgaacc aagggttga agcgggtattc
360
cgcgaatcat tccaatcga atcaccaaac aacgatatgg tcatggaata tggccattac
420
gttttgggag agccgaaacg cgatcccca gagtgcaaag aactgattc ttcttttgc
480
gttccactga aagcagtcac ccgtctcatc atcaaagaca ccggtgaaat ccgcaacaa
540
gtcgtctaca tgggtgacct tctgtgatg acagaccacg gaactttcat catcaatggt
600
gccgaaagg tagtggtgaag ccagttacac cgatctcctg gtattttctt ttcgtatgac
660
cagtacgag atacattttc tgcccagtg attccttata gtggatcatg gttagaattc
720
gagatggaca acaagggaat cctcgttgcc aaaatcgacc gtaagaaaaa attcccagcg
780
actctccttg tgaaagccat gggatatgga acaaacgaag aagtacttcg ctttttctac
840
ggatctagca aaatgaaaat cgctgggtgcc aatccaaaag acctcaaacg tctgattggc
900
cgccgaacca ttgcggatat tatcaatatg gaaaccggtg aggtaattgct cgatgctggt
960
tccaaaatta acgaagacaa tatctccatc ctctgtgaaa tgaaggtaaa agaagtggat
1020
gtcatcgaat ttccaaaagg aaaagacaat ccagttctca tcaattgcct agaaaaagac
1080
ggagtgaacg actacgagga tgcagtga aaatttcaca cgatcatgcg tccaggggaa
1140
ccttctacga ttgaaaacgc ggaagctgag ttaaaacgcc tctttttctc tccaaaaacg
1200
tttgatttag gaattgttgg tctttacaaa atcaatagca aattcgagtt caacaatcca
1260
aaagaattct caaaagcaga tgatcgggtt ctccgaaaac aagacatcat cgaaaccgtt
1320
cgttaccttg tgatgcttat gtcagaagcg gaaaattatt acccagatga cattgaccac
1380
ttaggaaaca gaaggatccg ttcgggtggg gaactcatcg ctaaccaatt gaaacttgg
1440
ttttccagag tggaacgagt catcaaagaa aggatgacag tacaggagcc ggaacaacaa
1500
actctcagc ttcttatctc catcaaacca atcacagcag tgatcaatga gttttttgga
1560
tcttcgaac tctctcagtt tatggacca accaatccct tggcagaact tacgcacaaa
1620
cgtaggttaa acgctcttgg gcctgggtgga ctttctcgtg atagagcagg ttttgaggtt
1680
cgtgacgttc attattctca ctacggtcgt atgtgcccc ttgaaacacc ggaaggtcca
1740
aacattggtc tcattctttc catgtctagt tttgcacgtg tgaacgatta tggattcatt
1800
gaaactccat accgccttgt aaagaatgga aaagtccaaa aacaagtgga atacctcact
1860
gcggacaaag aagaatacca ttatatggcg cagtcaaatt cgactgtgga tgagaaggga
1920

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gaattcactt ccaaactcat ttccactcgt catagagggg atttcccttt ccgtagccca
1980
gctgaaatcc aatacatgga tcttgctccc ttgcaagtgg tctcagtttc cacagctctc
2040
attccgttct tagaacatga tgacgcgaac cgtgccctca tgggttccaa catgcaacgc
2100
caagcggtag cactcttaac agaagaggct ccttttgctg gaactggtag ggaagctcgt
2160
gcggtttatg acgcaggggt ttgtatcgtt gcgaaaaaag atgggtgtgg ttccaaagt
2220
gatgcaacag gtgtttggat caaagaagac caatccaaag agattgtcca ttaccactc
2280
attaaattca aaaaaaccaa ccaaggtagt tgttttaacc aaaaaccaa cgtatccatg
2340
ttacacacca caactggtag caaggtagt aagggttcga aagaacgtgt cgaagtga
2400
actcctaacg gagaaaaaga aactcatgaa cttcttcttt ctgatgaagt tcagttccat
2460
gctgttgta aagaaggaca agaggtagga attggagctc cagttgccgg acaaatcatc
2520
aaaggggaaa aatacggtag cttcggtag atccttcaaa aaggaactgt cctagccaac
2580
gggccatcca ctgacgctgg gtatttgga cttggacgaa atgttctcgt tgcctttatg
2640
ccttggaag gatacaactt tgaggatgag attttaattt ctgaacgaat catcaaagac
2700
gatgttttct cttccatcca cattgaagaa ttcgaaatcc aagctcggga aacgaaactc
2760
ggacaagaac aaatcactcg tgacattcca aacctttcgg acaaagcgtt ccgtgatttg
2820
gatgagtctg gtgtgatccg tgtgggtgca gaggtaaaac ctggagacat cctagttggg
2880
atggtgactc caaaagggga aacagacctc acacctgaat acaaactatt aactccatt
2940
tttggagaga aggcaaaaga agttagggat tcctcactcc gtatgcaaaa cggtttcgaa
3000
ggaactgtca tcgatatcaa acgttattcc cgtgaaacag gcgatgaact cgctgctggc
3060
gtggaagaaa tggtaaaagt ttacgtggct cgaaacgga aactcctcgt ggggtgataag
3120
atggccggaa gacacgggaa caaaggggtc gtagcacgtg tgatggcaca agaagatatg
3180
ccatacatgg aagacggatc tccagttgac atcgtactca acccactcgg tgttccttcg
3240
cgtatgaacc tcggtcagat ctttgaaact caacttggat ttgctgcaaa aaaactaggg
3300
atcaattttg aaaccctgt gtttgacgga gcttccgaag gtgatgtaaa cgatttctgc
3360
aaaaaagcag gattaccgga aaacagcaaa tttcagttat atgatggaag gactggtgaa
3420
aaattcatca accaagtatt ctgtggatac atttacatgt tgaaactggc tcacttgggtg
3480
gatgacaaaa ttcacgcaag atccactgga cttactcac tcgtaacaca acaaccactg
3540
ggtggtaagg cgcagttcgg gggacaaagg ttaggggaga tggagtttg ggcactcgaa
3600
gcatacgggtg cctcacacac cttacaagaa ttactgacca tcaagtcaga tgacatgctc
3660
ggacgtgcca gaatttacga agcaattgtg aaagggatcc actcgatcaa accgggtatc
3720
cctgaatcct tcaacgttct tgtacaagaa ctccgaggtc tcgcacttga tatcatcatc
3780

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aaagactccg aaggattgga agtggatatc tctgattacg aagatgagtt ctcgaaaaac
3840
aaaaagaaaa ttaaattcga gaccattgaa aacgtt
3876

<210> 6
<211> 914
<212> ADN
<213> *Leptospira icterohaemorrhagiae*

<400> 6
ttcactattc tcactacggt agaattgtgtc cgattgaaac tccggaaggt ccgaacatcg 60
gtctgattct ttccatgtct tcttacgctc gtgtgaatga ctacggattc ttggaaaactc
120
cttacagaac cgtgaagaac ggtaaagtta ccggtcagat cgagcacctt accgcagaca
180
aagaagaata tcattacatc gctcaagctt ccggcgtgat cgatgaaaaa ggcgagctca
240
aaaacaaatt gatttccacg cgtcacagag gggatttccc tttccgtaac ccgagcgaga
300
ttcagtatat ggacttggck cctctacaag tcgtttcggg ttccacggcg ctgattccgt
360
tccttgaaca cgacgacgcg aaccgcgcct catgggttcc aacatgcaac gtcaggcggg
420
tcctcttctc cgtgaagaag ctcttttgta ggaactggta tggaaaccag agccgcttac
480
gattccagaa tttgtatcgt aaacaaacac gacggtgtcg taacttccgt cgatgcgga
540
aacatcgttg tagaaagaaa gggcggaaaa gaatccgata cgtatcaact tacgaaattc
600
aaaaagacaa accaaggaac tgctttaatc agaagccgat tgtaggagtg gttcactccg
660
agatcaatgg aaagggttcc aagggttcca aagaaaaaat cgaagtcact ggtgaaaacg
720
gtgaactgaa agaatatgtt cttcaaactc gaagcaaaca atattctccg atcgtctctg
780
caggcgaaga agtaaaaaga ggatcgactc tcgcaggaca agttgttgta ggtgagaagt
840
tggtgagat gggaaatatc ctcgtaaaag gaaccgttct tgctgatggg cctgcggtcg
900
acaacggagt tctc
914

<210> 7
<211> 949
<212> ADN
<213> *Leptospira australis*

<400> 7
gtgacgttca ctattctcac tacggtagaa tgtgtccgat tgaaactccg gaaggtccga 60
acatcgggtc gattctttcc atgtcttctt acgctcgtgt gaatgactac ggattcttgg
120
aaactcctta cagaaccgtg aagaacggta aagttaccgg tcagatcgag caccttaccg
180
cagacaaaga agaatatcat tacatcgctc aagcttccgg cgtgatcgat gaaaaaggcg
240
agctcaaaaa caaattgatt tccacgcgtc acagagggga tttcccttcc cgtaaccgga
300
gcgagattca gtatatggac ttggctcctc tacaagtcgt ttcggtttcc acggcgctga
360
ttccgttctt tgaacacgac gacgcgaacc gcgcctcat gggttccaac atgcaacgtc
420

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aggcggttcc tcttcttcgt gaagaagctc cttttgtcgg aaccggtatg gaaaccagag
480
ccgcttacga ttccagaatt tgtatcgtaa acaaacacga cgggtgctgta acttccgtcg
540
atgcggaaaa catcgttgta gaaagaaagg gcggaaaaga atccgatacg tatcaactta
600
cgaaattcaa aaagacaaac caaggaacct gctttaatca gaagccgatt gtaggagtgg
660
ttcactccga gattaacgga aaggtttcca aggtctccaa agaaaaaatc gaagtcactg
720
gtgaaaacgg tgaactaaaa gaatatgttc ttcaaactcg aagcaacaa tattctccga
780
tcgtctccgc aggcgaagaa gtaaaacgag gatcgactct cgcaggacaa gttgtttag
840
gtgagaagtt ggatgagatg ggaaatatcc tcgtaaaagg aaccgttctt gctgatggtc
900
ctgcggtcga caacggagtt ctgcgtctgg gaagaaacgt tctcgcggc
949

<210> 8

<211> 800

<212> ADN

<213> *Borrelia recurrentis*

<400> 8

aagggatcga gcagctttga agtaagatat gtacattata ccattatgg taggatgtgt 60
cctattgaaa ctctgaagg cccaaatatt ggacttattg tttctttggc tacttattca
120
aaagttaatg attatggttt cttagaaact ccttatagga aggtgattga tggtaagggtg
180
accgatgata ttgaatatTT gtctgctatt gatgaggaaa aaaaatgtat tgcgcaagca
240
aatgcttctg ttagttctga tggtaattat actgatgatt tgggtgtctgt taggatttct
300
ggggattata ctacaatgat gcctaaaaat atcgattaca tggatgtttc gcctagacaa
360
ttaatatctg tctcttcggc gttaatactt ttcttgaaca taatgatgca aatcgtgctc
420
ttatgggttc gaatatgcaa cgtcaggcag ttcttattat ttccacagcc acctattgtt
480
ggtagaggta tggagaggat agttgcaaaa gactctgggtg ttgttattaa agcaaaaaga
540
cctggtagag ttgtcttagc cacaacaaaa aagatagtta ttaaacctga taatgcaact
600
tctgaacgag atttagatga atatgaactt tataaatatg agaggacaaa ccaggatact
660
tctttcaatc attcagtttt ggtgaagaat ggccaaattg ttaataagga tgagataata
720
gcagatggtc ctgctactag atatggagaa ttggcgcttg gtaataattt attagttgtt
780
ttattccgtg gaatggattt
800

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/02481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMHUM6 'Online! EMBL; XP002140071 Database entry HSZ78027 Accession No. Z78027 identical to Seq. ID No 1 in 12 bp the whole document & ALAIBAC ET AL.: "High incidence of a T nucleotide at the second position of codon 97 in Vdelta2-Jdelta1 junctional sequences of human normal skin gamma-delta T-cells" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 33, 1996, pages 1035-1038, ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	WO 97 11162 A (ENDORECHERCHE INC ;LABRIE FERNAND (CA); LUU THE VAN (CA)) 27 March 1997 (1997-03-27) claim 18 --- -/--	1-3,5-8, 10,14,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2000

Date of mailing of the international search report

05/01/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 00/02481

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 44130 A (KIM BYUNG O ;CHOI DOCK JOON (KR); JUNG HYUNG JIN (KR); PARK MYUNG) 8 October 1998 (1998-10-08) page 15, line 10-18 ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	WO 96 23071 A (GILLILAND LISA K ;HOLLENBAUGH DIANE (US); SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 1 August 1996 (1996-08-01) page 80, line 39 ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	ALEKSHUN M ET AL: "Molecular cloning and characterization of Borrelia burgdorferi rpoB" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 186, no. 2, 28 February 1997 (1997-02-28), pages 227-235, XP004093305 ISSN: 0378-1119 cited in the application the whole document ---	1
X	WO 98 59034 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;FRASER CLAIRE M (US)) 30 December 1998 (1998-12-30) page 426-427; claims ---	1
X	WO 98 58943 A (DOUGHERTY BRIAN A ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); FRASER CLAIRE ()) 30 December 1998 (1998-12-30) the whole document ---	1
A	US 5 786 147 A (DIDIER RAOULT ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) the whole document ---	1-15
A	MOLLET C ET AL: "rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification." MOLECULAR MICROBIOLOGY, (1997 DEC) 26 (5) 1005-11., XP000920777 the whole document ---	1-15
P,X	RENESTO PATRICIA ET AL: "rpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera Borrelia, Treponema, and Leptospira." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 2200-2203, XP002155811 ISSN: 0095-1137 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02481

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711162	A	27-03-1997	US 6124115 A AU 6867896 A CA 2232500 A EP 0856048 A JP 11511329 T	26-09-2000 09-04-1997 27-03-1997 05-08-1998 05-10-1999
WO 9844130	A	08-10-1998	AU 6524898 A	22-10-1998
WO 9623071	A	01-08-1996	US 5876950 A AU 692074 B AU 4966996 A CA 2210419 A CZ 9702339 A EP 0807175 A FI 973120 A HU 9802401 A JP 10513348 T NO 973447 A PL 323565 A	02-03-1999 28-05-1998 14-08-1996 01-08-1996 12-11-1997 19-11-1997 25-07-1997 28-01-1999 22-12-1998 26-09-1997 14-04-1998
WO 9859034	A	30-12-1998	AU 8162398 A EP 0990022 A	04-01-1999 05-04-2000
WO 9858943	A	30-12-1998	AU 8151898 A AU 8153498 A EP 1009859 A EP 1012157 A WO 9859071 A	04-01-1999 04-01-1999 21-06-2000 28-06-2000 30-12-1998
US 5786147	A	28-07-1998	FR 2738827 A CA 2185738 A EP 0763602 A	21-03-1997 19-03-1997 19-03-1997



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/02481

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68 A61K38/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EMHUM6 'en ligne! EMBL; XP002140071 Database entry HSZ78027 Accession No. Z78027 identical to Seq. ID No 1 in 12 bp le document en entier & ALAIBAC ET AL.: "High incidence of a T nucleotide at the second position of codon 97 in Vdelta2-Jdelta1 junctional sequences of human normal skin gamma-delta T-cells" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 33, 1996, pages 1035-1038, ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	WO 97 11162 A (ENDORECHERCHE INC ;LABRIE FERNAND (CA); LUU THE VAN (CA)) 27 mars 1997 (1997-03-27) revendication 18 ---	1-3,5-8, 10,14,15
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/01/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Reuter, U

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mandr rnative No

PCT/FR 00/02481

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 44130 A (KIM BYUNG O ;CHOI DOCK JOON (KR); JUNG HYUNG JIN (KR); PARK MYUNG) 8 octobre 1998 (1998-10-08) page 15, ligne 10-18 ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	WO 96 23071 A (GILLILAND LISA K ;HOLLENBAUGH DIANE (US); SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 1 août 1996 (1996-08-01) page 80, ligne 39 ---	1-3,5-8, 10,14,15
X	ALEKSHUN M ET AL: "Molecular cloning and characterization of Borrelia burgdorferi rpoB" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 186, no. 2, 28 février 1997 (1997-02-28), pages 227-235, XP004093305 ISSN: 0378-1119 cité dans la demande le document en entier ---	1
X	WO 98 59034 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;FRASER CLAIRE M (US)) 30 décembre 1998 (1998-12-30) page 426-427; revendications ---	1
X	WO 98 58943 A (DOUGHERTY BRIAN A ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); FRASER CLAIRE () 30 décembre 1998 (1998-12-30) le document en entier ---	1
A	US 5 786 147 A (DIDIER RAOULT ET AL) 28 juillet 1998 (1998-07-28) le document en entier ---	1-15
A	MOLLET C ET AL: "rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification." MOLECULAR MICROBIOLOGY, (1997 DEC) 26 (5) 1005-11., XP000920777 le document en entier ---	1-15
P,X	RENESTO PATRICIA ET AL: "rpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera Borrelia, Treponema, and Leptospira." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 6, juin 2000 (2000-06), pages 2200-2203, XP002155811 ISSN: 0095-1137 le document en entier -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux numéros de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02481

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9711162 A	27-03-1997	US 6124115 A	26-09-2000
		AU 6867896 A	09-04-1997
		CA 2232500 A	27-03-1997
		EP 0856048 A	05-08-1998
		JP 11511329 T	05-10-1999
WO 9844130 A	08-10-1998	AU 6524898 A	22-10-1998
WO 9623071 A	01-08-1996	US 5876950 A	02-03-1999
		AU 692074 B	28-05-1998
		AU 4966996 A	14-08-1996
		CA 2210419 A	01-08-1996
		CZ 9702339 A	12-11-1997
		EP 0807175 A	19-11-1997
		FI 973120 A	25-07-1997
		HU 9802401 A	28-01-1999
		JP 10513348 T	22-12-1998
		NO 973447 A	26-09-1997
		PL 323565 A	14-04-1998
WO 9859034 A	30-12-1998	AU 8162398 A	04-01-1999
		EP 0990022 A	05-04-2000
WO 9858943 A	30-12-1998	AU 8151898 A	04-01-1999
		AU 8153498 A	04-01-1999
		EP 1009859 A	21-06-2000
		EP 1012157 A	28-06-2000
		WO 9859071 A	30-12-1998
US 5786147 A	28-07-1998	FR 2738827 A	21-03-1997
		CA 2185738 A	19-03-1997
		EP 0763602 A	19-03-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)